



FORMACIÓN CONTINUADA

Aplicaciones de la biología molecular en el trasplante renal

S. Lario, M. Bescós y J. M. Campistol

Unidad de Trasplante Renal. Hospital Clínic. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

La finalización del Proyecto Genoma Humano^{1,2} abre grandes posibilidades en el conocimiento de la fisiología y fisiopatología humanas. Los resultados del proyecto muestran que el genoma humano comprende alrededor 30.000 genes, un número significativamente inferior al esperado (alrededor de 100.000). Este hecho hace replantearnos la importancia de otros factores para explicar la complejidad del ser humano³. Así, no solo el número de genes, sino la forma en que están distribuidos en el genoma (los genes parecen estar agrupados en *clusters*, separados por grandes espacios de desierto génico), la presencia de variantes alélicas o de elementos repetitivos, las duplicaciones de genes o la metilación de secuencias reguladoras añaden gran complejidad a la interpretación del genoma. Asimismo, a nivel transcripcional y posttranscripcional —aportando diversidad a las proteínas— encontramos *splicing* alternativos, edición del RNA, fosforilaciones, acetilaciones, etc. El advenimiento de la genómica —estudio del genoma en su conjunto— como de la proteómica —estudio de las proteínas que se expresan en un momento determinado en una célula— nos permitirán conocer cuales son las bases moleculares del rechazo tanto agudo como crónico del injerto, que efectos tienen los inmunosupresores sobre el estado celular, cuales son las susceptibilidades de cada paciente y que tratamiento inmunosupresor es el más adecuado en cada caso. Asimismo, la terapia génica permitirá controlar la expresión de determinados genes diana con el objetivo de eliminar el tratamiento inmunosupresor.

En la presente revisión describiremos primero las

nuevas metodologías que han emergido en los últimos años aplicables al trasplante renal para proseguir con sus aplicaciones tanto en el conocimiento de los mecanismos del rechazo agudo y crónico como en su diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

NUEVAS METODOLOGÍAS

Los actuales marcadores fluorogénicos y las técnicas de miniaturización han revolucionado en los últimos años las metodologías en biología molecular. En este apartado repasaremos los conceptos de PCR en tiempo real y microarrays que están actualmente implantándose en los laboratorios tanto de investigación como de diagnóstico.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

a) Aplicaciones en la cuantificación de RNAm

La principal limitación de las metodologías clásicas de cuantificación de RNA mensajero (RNAm) como el Northern-blot o el ensayo de protección de la RNAsa es la limitada cantidad de RNA total que se obtiene de una biopsia renal. La retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha permitido en estos últimos años determinar los niveles de expresión de numerosos genes relacionados con el rechazo tanto agudo como crónico en biopsias renales humanas. La RT-PCR puede ser semicuantitativa o cuantitativa. La RT-PCR semicuantitativa nos informa de los niveles del gen a estudio en referencia a un gen de expresión constitutiva, de manera similar a como lo hace el Northern-blot. Los principales problemas relacionados con esta metodología son la necesidad de que los genes constitutivos no alteren su expresión durante el proceso patológico o durante el tratamiento experimental y que la medida se realice en la fase exponencial de amplificación de la PCR. Los métodos

Correspondencia: Dr. Josep M.^a Campistol
Unidad de Trasplante Renal
Hospital Clínic de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona
E-mail: jmcampis@medicina.ub.es

cuantitativos⁴ salvan estos problemas por el uso de un competidor sintético interno de la reacción, que puede ser de DNA o de RNA, que es coamplificado con el gen a estudio ya que comparte la misma secuencia interna y los mismos cebadores. La cuantificación se realiza mediante un banco de diluciones que contiene cantidades decrecientes de competidor y una cantidad constante de cDNA de la muestra problema. Las intensidades relativas del competidor frente a la muestra problema determinarán la cantidad de cDNA presente en la muestra problema expresándose los resultados absolutos en moléculas por μg de RNA total retrotranscrito. La RT-PCR cuantitativa presenta, no obstante, varios inconvenientes

entre los que destacan su dificultad de diseño ya que el competidor sintético debe presentar una eficiencia de amplificación similar al gen de estudio, el consumo de mayor cantidad de cDNA que una RT-PCR semicuantitativa ya que para cada determinación se necesita un banco de diluciones, siendo, por último, una metodología laboriosa y compleja de optimizar. Un ejemplo de PCR cuantitativa y detección en gel de agarosa con bromuro de etidio se muestra en la figura 1. Todos estos inconvenientes hacen que la PCR cuantitativa sea una técnica poco extendida por su difícil implementación en el laboratorio, sobre todo cuando el número de genes y la cantidad de biopsias a estudiar es alto.

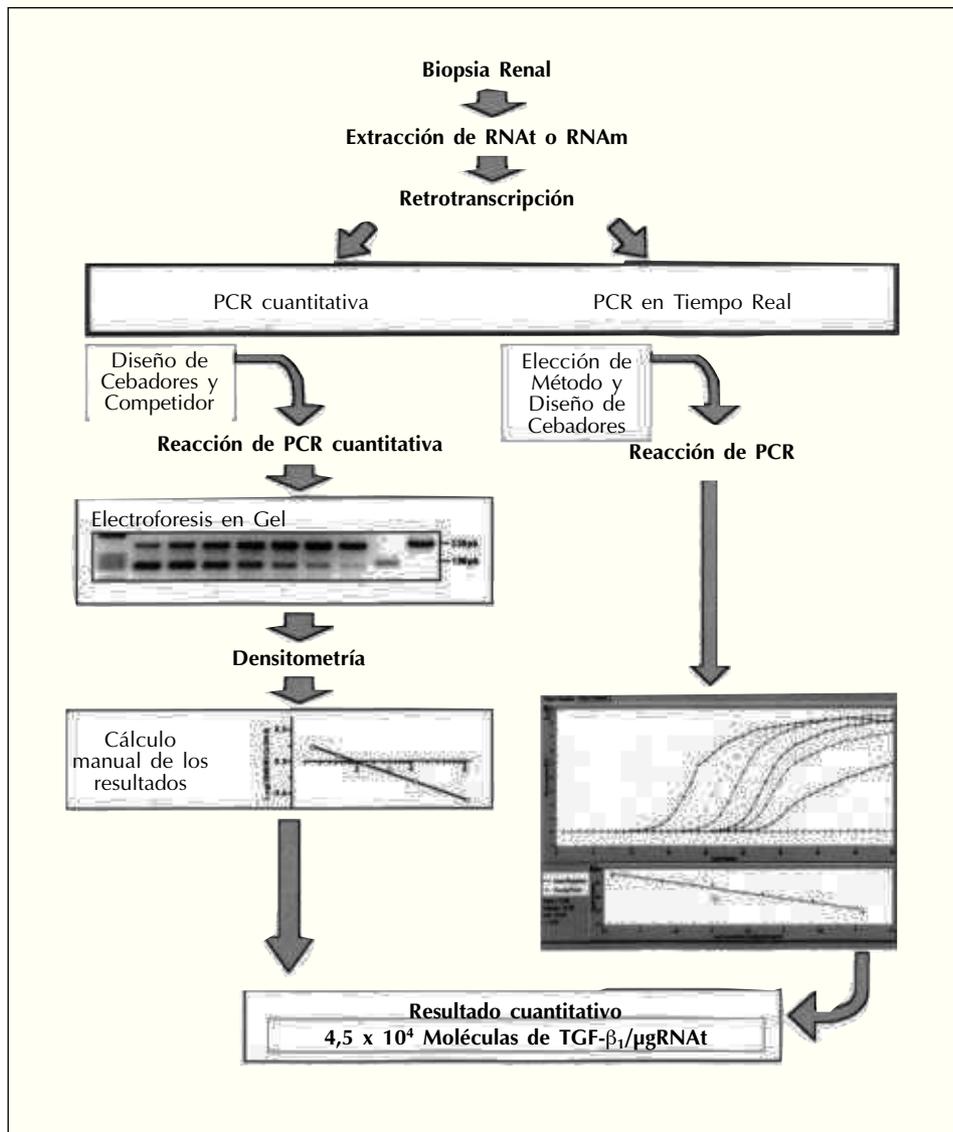


Fig. 1.—Esquema comparativo para cuantificación de RNAm entre la PCR cuantitativa con competidor interno y la PCR en tiempo real.

En los últimos años se ha impulsado el desarrollo de nuevos marcadores fluorescentes que permiten detectar en tiempo real la cantidad de producto de PCR que se está generando en cada ciclo, denominándose a estas nuevas metodologías RT-PCR en tiempo real o RT-PCR cinética^{5,6}. Estas nuevas técnicas permiten realizar un seguimiento en tiempo real del proceso de amplificación para cada una de las muestras a estudio con una gran sensibilidad y especificidad, sin embargo su gran ventaja es la enorme reducción en la fase de análisis ya que el resultado se obtiene al final del proceso de PCR sin necesidad alguna de manipulación post-PCR (electroforesis y densitometría). Asimismo, la cantidad de

cDNA necesaria se reduce y se evita la contaminación, puesto que el proceso de PCR y su análisis se realiza en el mismo tubo (fig. 1). En la actualidad hay dos formas de detectar en tiempo real los productos de PCR, el primero es por medio del uso de SYBGreen (Molecular Probes), un marcador fluorescente que se une específicamente al DNA de doble cadena. El segundo es por el uso de distintas clases de sondas que hibridan sobre la cadena de DNA que se está amplificando emitiendo en ese momento fluorescencia. Entre estas últimas destacan las sondas de hibridación (LightCycler system de Roche Molecular Diagnostics), las sondas de hidrólisis (Taq-man assay de Applied Biosystems), y los faros mo-

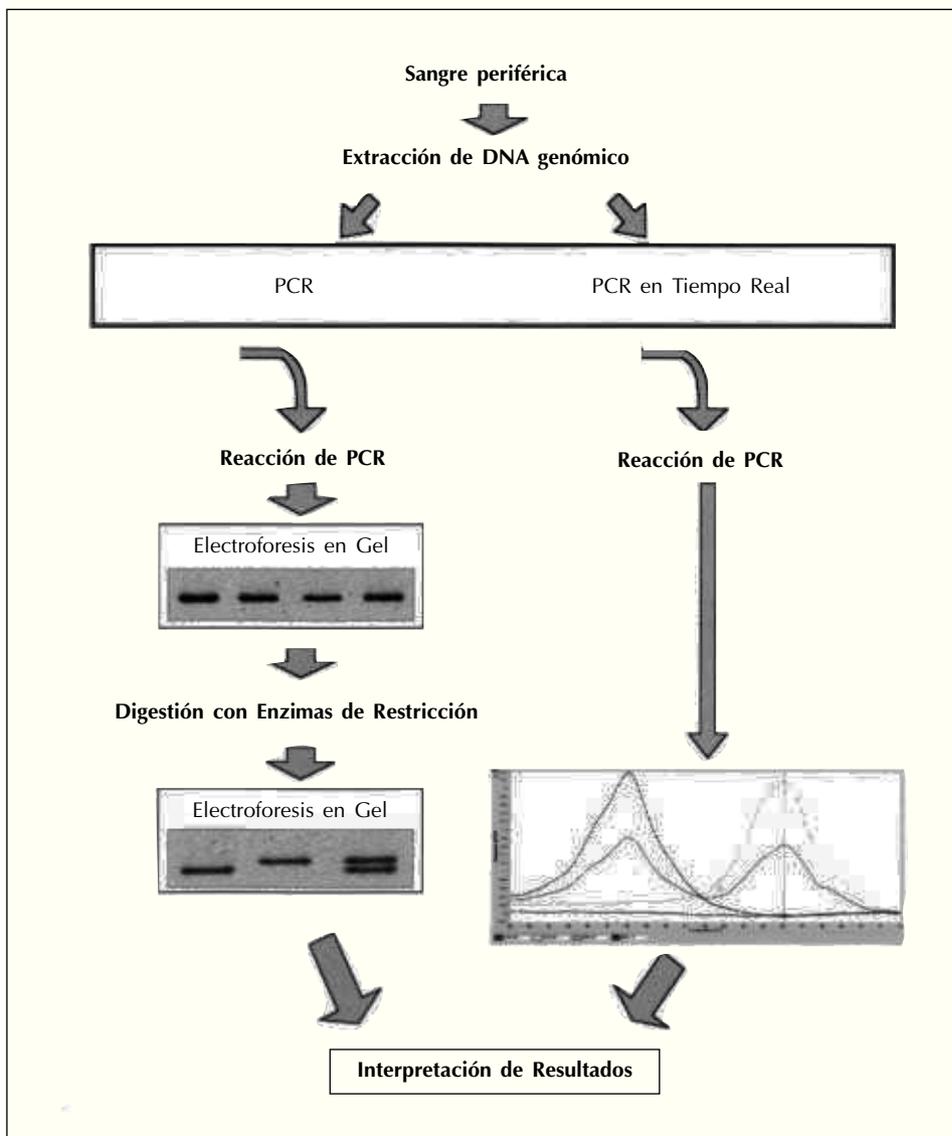


Fig. 2.—Esquema comparativo entre el genotipado por PCR y posterior digestión con enzimas de restricción y la PCR en tiempo real.

leculares (*Molecular Beacons* de Stratagene). Tras la hibridación, los productos de PCR son excitados por un haz de láser (sistema de Applied Biosystems) o un diodo de luz azul (sistema Lightcycler). La emisión fluorescente es registrada y analizada por un software específico, determinándose el *crossing point* (Cp) para cada una de las muestras, que representa el número de ciclo de PCR en el que las muestras inician su fase de crecimiento exponencial. Los resultados pueden ser absolutos si se ha diseñado una curva estándar o semicuantitativos si se compara con un gen de expresión constitutiva.

b) Aplicaciones en la detección de polimorfismos/mutaciones

Varios son los métodos que se han utilizado hasta ahora para el genotipado⁷, entre los que destacan la pérdida o ganancia de sitio de restricción sobre DNA genómico (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) o previa amplificación por PCR (*restriction site polymorphisms*, RSP), PCR alelo-específica (*amplification refractory mutation system*, ARMS), o la hibridación sobre membranas utilizando oligonucleótidos alelo-específicos (*allele-specific oligonucleotides*, ASO), entre otros. De similar modo a la cuantificación de RNAm por medio de PCR en tiempo real, el uso de estos sistemas con sondas específicas reduce significativamente el tiempo de análisis cuando se desean detectar polimorfismos o mutaciones. Se evita el uso de enzimas de restricción y la posterior identificación de los alelos por electroforesis reduciendo enormemente los costes en tiempo y material. La comparación de un método tradicional por medio de enzimas de restricción frente a un genotipado por PCR en tiempo real se muestra en la figura 2.

Microarrays

Un microarray se define como un sistema miniaturizado de cientos o miles de secuencias de DNA de identidad conocida, ordenadas en un orden lógico en diferentes posiciones de un soporte que puede ser de vidrio, silicio (chip) o membranas de hibridación⁸. En función de su aplicación se clasifican en⁹: 1) arrays de DNA genómico humano; 2) arrays de DNA bacteriano o vírico; 3) arrays de cDNA o de expresión, y 4) arrays de oligonucleótidos, siendo estos dos últimos donde encontramos la mayoría de las aplicaciones en el trasplante renal. Los arrays de DNA genómico se utilizan para la detección de ganancias o pérdidas de DNA genómico,

esta metodología es sobre todo aplicable en oncología a la clasificación de tumores, origen de las metástasis y pronóstico. Los arrays de DNA bacteriano o vírico se utilizan en la detección y clasificación de microorganismos como por ejemplo el chip para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o el chip para el papillomavirus (HPV).

a) Arrays de expresión (o cDNA)

El objetivo de estos arrays es determinar diferencias en la expresión de un número variable de genes entre una muestra patológica y una muestra control. Los DNA distribuidos sobre el soporte provienen de amplificaciones por PCR de librerías de cDNA. El proceso es el siguiente (fig. 3): los RNA de la muestra control y patológica son retrotranscritos a cDNA y marcados con diferentes fluorocromos (generalmente Cy3 y Cy5), dejándose posteriormente co-hibridar —hibridación competitiva sobre el microarray que contiene los cDNA de los genes de interés (pueden ser genes de función conocida o no). Tras la co-hibridación, el microarray es lavado y escaneado por un haz de láser para cada longitud de onda de los dos marcadores fluorescentes, separando de esta manera las intensidades de los RNA provenientes de la muestra de referencia de las intensidades de la muestra patológica. Posteriormente, se analizan los ratios de fluorescencia muestra patológica / referencia para cada uno de los puntos del microarray, asociándose cada una de las intensidades a un gen determinado⁸.

Son limitados los grupos que han aplicado microarrays de expresión en el trasplante, recientemente Akalin y cols.¹⁰ han publicado resultados en biopsias humanas de pacientes con rechazo agudo. El estudio consistió en comparar el patrón de expresión de tres biopsias con histología normal frente a siete biopsias con rechazo agudo utilizando el sistema GeneChip de Affymetrix que contiene 6.800 cDNAs de secuencia completa. Alrededor de 200 transcritos presentaron una regulación al alza durante un episodio de rechazo agudo, la mayoría relacionados con activación del sistema inmune e inflamación. Únicamente 10 eran compartidos por la mayoría de biopsias, entre ellos la quimiocina MIP- β 3, la molécula de adhesión CD18, la C3 del complemento, o factores relacionados con citocinas (*IL2-stimulated phosphoprotein*, *IFN- α -induced transcriptional activator*). También confirman la regulación a la baja del *epidemic growth factor* (EGF) y el kininógeno. Sorprendentemente de entre estos 10 genes compartidos no encontraron marcadores de activación de células T.

La gran utilidad de los microarrays no está exenta de dudas e incertidumbres¹¹, la gran cantidad de información que generan crea problemas de interpretación y presentación de los resultados. Asimismo, la necesidad de establecer qué se considera un tejido de referencia se agrava cuando la expresión de miles de genes es comparada con un estado patológico. La expresión está, además, influenciada por el sexo, la edad o la variación genética entre poblaciones. Otro problema adicional es la heterogeneidad del tejido a estudio: una biopsia renal contiene células endoteliales, vasculares, podocitos, epiteliales tubulares de varios subtipos, fibroblastos, células sanguíneas... cada

una de la cuales puede estar a su vez sufriendo proliferación, necrosis, apoptosis, hipertrofia, transdiferenciación... lo que hace difícil la comparación entre muestras. Este problema se subsana, en parte, por la posterior confirmación de los resultados por hibridación *in situ*. Asimismo, la microdissección por captura láser permite recolectar miles de células de un determinado subtipo en un corte histológico con una pureza del 95-98% (o incluso capturar una única célula). Esta posibilidad genera nuevos problemas ya que el limitado número de células obliga a aplicar nuevas metodologías como la amplificación del RNA (aRNA)¹² previas a su aplicación al microarray. Otros pro-

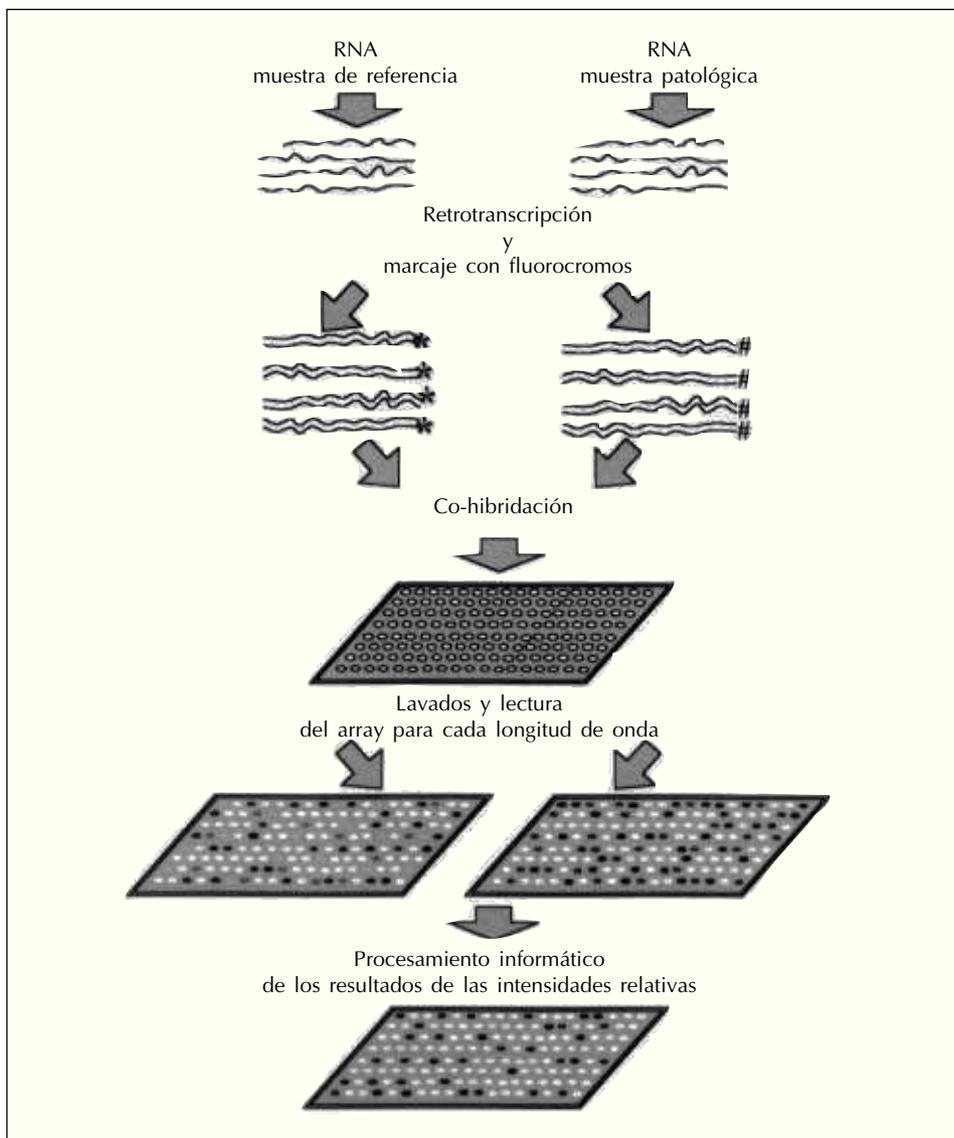


Fig. 3.—Esquema representativo de un microarray de cDNA.

blemas a los que se enfrentan los arrays de expresión es su sensibilidad y especificidad. Un array posee una sensibilidad de alrededor de 10 RNA mensajeros por célula, un valor que es similar al Northern-blot¹³. En cuanto a la especificidad el principal problema es la cohibridación entre cDNAs de secuencia homóloga. Esto crea la necesidad de confirmar los resultados de los arrays por otras metodologías más específicas como el Northern-blot o la PCR en tiempo real. Por otro lado, se hacen necesarios estudios de confirmación a nivel de proteína ya que cambios en la expresión de los genes no tienen porque reflejarse en cambios en la expresión de proteínas, de hecho se ha descrito una pobre correlación entre los niveles de RNAm y los niveles de proteína¹⁴. Además, los estudios de expresión de RNAm no tienen presente la vida media de las proteínas, sus interacciones o sus modificaciones postranscripcionales, campo donde entra la proteómica. Se cree actualmente que el genoma humano posee entre 30.000 y 40.000 genes y que éstos, con sus variantes de *splicing*, y las modificaciones postraduccionales son capaces de dar lugar a un millón de proteínas diferentes. Caracterizar el perfil proteico de una célula en un determinado estadio o en respuesta a un determinado estímulo es la labor de la proteómica¹⁵. La complejidad de la proteómica es mucho mayor que la de la genómica. Las proteínas presentan una dinámica importante, son modificadas, excretadas, degradadas, compartimentalizadas, interaccionan entre ellas... siendo su estudio por tanto de gran dificultad. La proteómica utiliza como base la electroforesis bidimensional acoplada a espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-associated laser desorption time-of flight*) para separar e identificar las proteínas o bien microarrays de anticuerpos, limitados estos últimos por la disponibilidad de anticuerpos específicos. Asimismo, las interacciones entre proteínas se pueden determinar por *two-hybrid systems*. La proteómica se ha aplicado recientemente a la determinación del perfil proteico (proteoma) de muestras de orina, constatándose que la orina posee una mayor complejidad proteica de lo que se pensaba, abriéndose nuevas perspectivas diagnósticas y pronósticas.

b) Arrays de oligonucleótidos

Estos microarrays se utilizan en el *genotipado* tanto de SNPs como de inserciones/delecciones⁷. La idea básica es muy similar a los arrays de expresión, sólo que en este caso el soporte está cubierto por

oligonucleótidos que representan las variables alélicas de interés. Los DNA problema son amplificados por PCR con el objetivo de incorporar nucleótidos marcados con fluorescencia que posteriormente se hibridan con el microarray, en éste cada oligonucleótido se comporta como una sonda alelo-específica. Tras los lavados, la fluorescencia de cada punto es leída y la información es procesada, asociándose cada señal a una determinada variante alélica. Un ejemplo de esta metodología es la reciente validación de un array de oligonucleótidos para el genotipado e identificación de nuevos SNPs en los exones 2 y 3 del gen HLA-B¹⁶.

Otras metodologías

Nuevas metodologías están apareciendo constantemente⁷. Para el genotipado de gran número de SNPs destacan la espectrometría de masas MALDI-TOF en la que las variantes alélicas se distinguen por su masa molecular, la pirosecuenciación (Pyrosequencing AB), el *invader assay* (Third Wave Technologies), el *rolling circle amplification* (RCA) estos dos últimos caracterizándose por ser independientes de la amplificación por PCR. Para la determinación de la expresión de gran cantidad de RNAm, además del *serial analysis of gene expression* (SAGE) de uso limitado ya que requiere de una considerable cantidad de RNA, ha aparecido recientemente el *massively parallel signature sequencing* (MPSS) de Lynx Therapeutics.

A continuación describiremos las principales aplicaciones de estas nuevas metodologías en los ámbitos del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las complicaciones del trasplante renal.

UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO

Rechazo agudo

a) Biopsias renales

Entre los marcadores moleculares de rechazo agudo destacan las citocinas^{17,18}. Las citocinas pueden actuar como mediadores autocrinos o paracrinos en respuestas inmunes o inflamatorias. Las citocinas se han clasificado en función de si favorecen las respuestas inmunes o si favorecen tolerancia en citocinas tipo-1 y 2, respectivamente. Entre las citocinas de tipo-1 las más destacadas como mediadoras de rechazo y activadoras de macrófagos destacan la interleucina (IL)-2, el interferón- γ (INF- γ) y el tumor necrosis factor- β (TNF- β); mientras que IL-4,

IL-5, IL-6, IL-10 pertenecen al tipo-2. El patrón de expresión de estas moléculas en biopsias renales se puede asociar a la activación del endotelio en el post-trasplante inmediato (síndrome de isquemia/reperfusión), al desarrollo de rechazo agudo o a la eficacia del tratamiento inmunosupresor. En este sentido, previa a la respuesta allogénica, durante el trasplante se produce un aumento de expresión en las células endoteliales de citocinas que a su vez resultará en un aumento de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) acompañado del aumento de factores quimiotácticos para macrófagos que acabará desembocando en la infiltración del tejido. La tolerancia se asocia, en general y bajo excepciones, a una menor respuesta de las citocinas tipo-1 y a una mayor expresión de las tipo-2. Así, los niveles elevados de IL-2 e INF- γ RNAm preceden al rechazo agudo en modelos experimentales, mientras que en la clínica los resultados son más conflictivos dependiendo en gran parte de la variabilidad de los pacientes, del momento en el que se toma la biopsia, de la redundancia de acciones de las citocinas o del tratamiento inmunosupresor. La eficacia o la selección del tratamiento inmunosupresor también son susceptibles de ser estudiadas por los niveles de expresión de ciertas citocinas en biopsias renales. Así, los inhibidores de la calcineurina —ciclosporina A (CsA) y FK506— producen una inhibición en la expresión de citocinas tipo-1, mientras que la rapamicina y el micofenolato inhiben la proliferación celular por medio de la inhibición del ciclo celular o la síntesis de DNA, no afectando los niveles de expresión.

b) Fracción celular de la orina

Las potenciales complicaciones y riesgos asociados a la obtención de biopsias renales después del trasplante renal llevó recientemente a Baogui y cols.¹⁹ a desarrollar un método no invasivo de diagnóstico basado en la expresión de granzima B y perforina en células provenientes de orina de pacientes trasplantados. La granzima B y la perforina forman parte de la maquinaria lítica de las células citotóxicas presentes durante el proceso de rechazo agudo. La metodología se basa en la sedimentación de las células, posterior extracción del RNA, retrotranscripción y realización de PCR competitiva por los métodos tradicionales. Ambos genes se comportaron como buenos marcadores de rechazo, no detectándose cambios de expresión en pacientes con función normal del injerto ni en pacientes con nefropatía crónica del injerto. La especificidad y sensibilidad fue de alrededor del 80%. La ex-

presión de estos y otros marcadores moleculares de rechazo en orina se muestra pues como un buen sistema para reducir el número de biopsias en los pacientes y puede ser aplicado en un futuro a otras patologías renales incluido el rechazo crónico del injerto. La PCR en tiempo real podría en este caso aportar una mayor sensibilidad y especificidad, así como un menor tiempo de procesado de las muestras.

c) Fracción no celular de la orina

La fracción no celular también es susceptible de ser estudiada por métodos de biología molecular, en este sentido se ha detectado DNA del donante en plasma y orina del paciente receptor²⁰. El estudio se realizó sobre mujeres en la que el donante era un hombre, determinándose el número de copias por PCR en tiempo real del gen *SRY* (específico del cromosoma Y) y de la β -globina como control de referencia. Observaron que el 85% de las mujeres que recibieron un riñón de un hombre presentaban secuencias en la orina para SYR y el 100% presentaban secuencias para la β -globina describiendo por primera vez quimerismo en la orina. Asimismo, en un subgrupo de pacientes, independientemente de si el donante era hombre o mujer, observaron que durante los episodios de rechazo agudo el número de copias de la β -globina en la orina aumentaba significativamente, disminuyendo tras la terapia inmunosupresora. Esto abre nuevas posibilidades en el diagnóstico temprano del rechazo agudo, aunque se necesitan más estudios para confirmar estos resultados y para determinar el origen del DNA.

RECHAZO CRÓNICO

El rechazo crónico del injerto se presenta como la pérdida progresiva de la función del injerto acompañada de proteinuria e hipertensión arterial, caracterizándose por la proliferación de las células musculares lisas de los vasos que provocan un estrechamiento de arterias y arteriolas acompañada de deposición de matriz extracelular intersticial y glomerulosclerosis. Otros tipos celulares están además implicados en este proceso como las células endoteliales y macrófagos/monocitos capaces de producir también factores profibróticos como el transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), la IL-1 o la IL-6. Las causas del rechazo crónico se han clasificado en antígeno dependientes e independientes²¹. Entre las antígeno dependientes destaca la presencia de episodios de rechazo agudo como factor de riesgo para

el futuro desarrollo de rechazo crónico. Entre los antígeno independientes resaltan la lesión por isquemia/reperfusión, la hipertensión, las anomalías lipídicas, la nefrotoxicidad por CsA o la edad avanzada del donante. Se ha prestado especial interés en los últimos años a TGF- β_1 ya que es el principal responsable de la reparación tisular regulando la expresión de genes directamente relacionados en la síntesis y degradación de la matriz extracelular como el *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), las metaloproteasas (MMP) y sus inhibidores (TIMPs), o colágenos de varios tipos^{22,23}. Asimismo es de gran importancia el papel que juegan tanto los inhibidores de la calcineurina (CsA, FK506) como la activación del sistema renina-angiotensina en la inducción de TGF β_1 en el contexto del rechazo crónico. TGF- β_1 presenta asimismo efectos opuestos en la proliferación celular, siendo un estímulo para la proliferación de fibroblastos y células mesangiales e inhibiendo la proliferación de las células tubulares epiteliales²⁴. También se ha prestado gran interés a otros factores de crecimiento como el *platelet derived growth factor* (PDGF), el *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), el *epidermal growth factor* (EGF), el *connective tissue growth factor* (CTGF), o el *vascular endothelial growth factor* (VEGF) que ven alterada su expresión por varios estímulos que acontecen durante (hipoxia, lesión por isquemia/reperfusión) o tras el trasplante (rechazo, muerte celular, inhibidores de la calcineurina, hipertensión). La complejidad en la interacción de estos factores aumenta cuando entra en juego la composición de la matriz extracelular, muchas de las acciones de estos factores de crecimiento vienen reguladas por ciertas proteínas como la trombospodina, la decorina, o el *serin protein acidic and rich in cystein* (SPARC) presentes en la matriz en un proceso denominado crinopexia²⁵.

El origen de la activación o inhibición de estos factores de crecimiento es desconocido, se postula que la pérdida de masa renal da lugar a un aumento de la tasa de filtración glomerular, que desemboca en estrés por cizallamiento que a su vez provoca el aumento de ciertos factores de crecimiento —como TGF- β_1 o PDGF responsables de la proliferación de las células mesangiales y de la deposición de matriz extracelular²⁵.

Así, los factores de crecimiento, los genes relacionados con el remodelado de la matriz, las sustancias vasoactivas (angiotensinógeno, endotelina-1), y los genes implicados en la supervivencia celular (Bax, Bcl-2, caspasas) son potenciales marcadores de expresión en el diagnóstico y seguimiento del rechazo crónico del injerto, aunque la interpretación de los resultados debe tomarse con reservas ya que es una patología multifactorial.

PRONÓSTICO

Polimorfismos

La reciente finalización del Proyecto Genoma Humano nos muestra que los seres humanos compartimos el 99,9% de la secuencia de nucleótidos. El 0,1% restante responde a variantes que se clasifican en *single nucleotide polymorphisms* (SNP), repeticiones de dinucleótidos y microsatélites³. Los SNPs se presentan como sustituciones de nucleótidos que están presentes con una frecuencia superior al 1%. Los SNPs se presentan generalmente como bialélicos y, de media, podemos encontrar 1 cada 1.250 pares de bases, conociéndose en la actualidad alrededor de 1,4 millones de SNPs de los que el 4% (unos 60.000) se encuentra en regiones codificantes del genoma. Los SNPs en las regiones no codificantes (intrones, regiones reguladoras en los extremos 5' y 3') también pueden dar lugar a alteraciones en la expresión de ciertos genes.

Una de las futuras aplicaciones de la biología molecular al pronóstico es la de explicar motivo y bajo que mecanismos el aproximadamente 20-30% de los pacientes con similar HLA y bajo el mismo tratamiento inmunosupresor desarrollan rechazo agudo²⁶. La variabilidad genética de los pacientes podría explicar esta heterogeneidad en la respuesta al tratamiento y a su vez explicar las diferentes tasas de supervivencia del injerto. El cambio funcional a que dan lugar estos polimorfismos está todavía por elucidar, sin embargo podrían afectar a la tasa de expresión del gen, a la actividad de la proteína, a la interacción con los receptores, a su señalización o a su estabilidad. En este sentido se ha comprobado por ejemplo que ciertos alelos en las regiones promotoras del TNF- α y de la IL-10 van asociados a una mayor o menor producción de estas citocinas. Los actuales genes candidatos (tabla I) van más allá del CMH e incluyen citocinas, quimiocinas —y sus respectivos receptores—, moléculas de adhesión, moléculas presentadoras de antígeno, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas, entre otros. Los estudios de asociación que se han realizado con estos genes muestran resultados dispares (para una revisión en este sentido consultar Suthantiran y cols.²⁶ y Akalin y cols.²⁷). El rechazo agudo o crónico del trasplante, el efecto del tratamiento inmunosupresor, el papel que desempeñan las posteriores complicaciones como las infecciones o la hipertensión son, en conjunto, complejos (poligénicos) y, por tanto, difíciles de analizar con estudios de asociación de unos pocos genes. El advenimiento de las nuevas tecnologías,

como los microarrays de oligonucleótidos, nos mostrarán el perfil genético del paciente y la interconexión de los diferentes genes implicados en este proceso, pudiéndose en un futuro personalizar el tratamiento inmunosupresor.

Las diferencias en las diferentes respuestas al tratamiento es el campo de estudio de la farmacogenética²⁸; los genes que codifican para las proteínas diana de los inmunosupresores pueden estar expresados al alza o la baja, o estar mutados dando lugar a una respuesta alterada al tratamiento. Este efecto puede ocurrir a varios niveles que incluyen la absorción, distribución o eliminación del fármaco. En este sentido uno los genes diana estudiados en el ámbito del trasplante es la glicoproteína-P (P-gp). P-gp modula la acción de varios fármacos como la CsA, la rapamicina o el FK506, un aumento en la expresión de este gen podría limitar el acceso de estos inmunosupresores a las células diana. Otros ejemplos serían alteraciones de la expresión de la inosina monofosfato deshidrogenasa que podrían alterar la respuesta al micofenolato mofetil o mutaciones en la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa para la azathioprina. Una lista de los posibles candidatos para este tipo de estudios farmacogenéticos de detalle en la tabla II.

UTILIDAD EN EL TRATAMIENTO: TERAPIA GÉNICA

Los efectos secundarios asociados a una continua administración de inmunosupresores como la aparición de infecciones oportunistas o cáncer ha llevado en los últimos años a buscar nuevas aproximaciones al tratamiento del rechazo agudo como crónico. Una es la terapia génica que se define como la introducción en las células somáticas, mediante un vector, de material genético externo con la finalidad de corregir un gen anómalo, de añadir una nueva función a un tipo celular o la de inhibir una determinada respuesta celular²⁹. En un principio la terapia génica se concibió para la corrección de genes alterados heredados, pero además se está aplicando actualmente como sistema de liberación de ciertos productos génicos potencialmente beneficiosos en el tratamiento. La transferencia génica se puede realizar *in vivo* sobre todo el organismo o *ex vivo* bien sobre determinadas células del paciente que se extraen, modifican y se vuelven a implantar o bien, sobre un órgano (esta es una de las grandes ventajas del trasplante renal ya que permite modificar el riñón evitando la potencial toxicidad del tratamiento sobre el individuo).

Tabla I. Polimorfismos estudiados en el trasplante renal

Grupo	Gen	Alelos	
Citocinas y sus receptores	TNF- α	-308 G/A	
		-238 A/G	
	IL-10	+488 A/G	
		-1.082 G/A	
	IL- α	-819 C/T	
		-592 C/A	
	IL- β	-889 T/C	
		-511 T/C	
	IL-1R	+3.692 T/C	
		970 C/T	
IL-4	-590 T/C		
	IL-4R	+1.092 G/A	
IL-6	-174 G/C		
		+3.247 G/A	
Factores de crecimiento	IFN- γ	(CA) _n	
	TGF- β 1	-880 G/A	
		-509 C/T	
	VEFG	Codón 10	
Codón 25			
Moléculas de adhesión	ICAM-1	-1.154 G/A	
		-2.578 C/A	
	L-selectina	+241 G/C	
		+469 E/K	
E-selectina	+206 F/L		
		+128 S/R	
Moléculas co-estimuladoras	CTLA4	+554 L/F	
		(AT) _n Exón 3	
Sustancias vasoactivas	ECA	+49 (A/G)	
	Angiotensinógeno (AGT)	I/D	
	Receptor AT-1	M/T	
Quimiocinas	CCR5	A/C	
		CCR5 Δ 32	
	CCR2	59.029 A/G	
	CX3CR1	V64I	
Metabolismo de los inmunosupresores	CYP3A4	V249I	
		Multidrug Resistance-1 (MDR-1)	T280M
			V
		C3435T	

Se han descrito varios tipos de vectores aplicables al trasplante renal, su elección depende del procedimiento de liberación de éste para obtener la respuesta en el tipo celular adecuado sin alterar las células u órganos adyacentes, el método con el que se va regular la expresión del gen, el tiempo necesario que se ha de expresar y la bioseguridad^{30,31}. Los vectores más comunes incluyen retrovirus y adenovirus modificados y liposomas^{31,32}. Se diferencian por la eficiencia de transducción, la estabilidad de expresión y de la necesidad o no de que la célula huésped se esté dividiendo. Así, los retrovirus necesitan que la célula diana se esté dividiendo para insertarse en el genoma, pero presenta la ventaja de

Tabla II. Posibles candidatos en la farmacogenética

	Gen	Efecto
Síntesis de nucleótidos	Inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HPRT1)	Resistencia a MMF/AZA
Metabolismo de los inmunosupresores	Citocromo P450 mono-oxigenasa isoforma 3A4 (CYP3A4) Tiopurina S-metil transferasa (TPMT)	Exceso de actividad de CsA/AZA
Señalización por calcineurina	Calcineurina Factor de transcripción NF-AT	Resistencia a CsA/FK506
Señalización por mTOR	<i>Mammalian target for rapamycin</i> (mTOR) P70s6K	Resistencia a rapamicina

que su inserción es permanente y estable. Los adenovirus no necesitan células en división, pero crean más problemas de reconocimiento inmunológico y su expresión es menos duradera. Los sistemas virales además presentan potenciales problemas de bioseguridad. En este sentido los liposomas son más seguros pero transducen con baja eficiencia, presentando además un nivel de expresión transitorio. Se han propuesto varios mecanismos para controlar la expresión del transgén²⁹ como el operón de resistencia a la tetraciclina de *E. coli*, en el que la expresión viene determinada por la presencia de tetraciclina, el sistema regulado por ecdisona —una hormona esteroidea de insectos— capaz de regular más finamente la expresión del gen, o el sistema Cre-loxP.

En el trasplante renal son tres los puntos donde es potencialmente aplicable. El primero es la prevención de la lesión provocada por el daño de isquemia reperfusión y apoptosis³⁰. En este sentido, la introducción en el injerto de hemo-oxigenasa 1 y Cu/Zn-superóxido dismutasa redujeron los niveles de radicales libres en un modelo de trasplante hepático y la sobreexpresión de Bcl-2 protegieron al injerto de apoptosis. El segundo es la inducción de tolerancia en la prevención del rechazo agudo por el bloqueo de la activación de las células T durante la adhesión, el reconocimiento o la coestimulación³³. La transducción de ciertas citocinas inmunomoduladoras, como el TGF- β o la IL-10, son capaces de alargar la supervivencia de injertos corazón³⁰. También se ha testado con éxito la producción local de CTLA4Ig, una proteína de fusión homóloga al receptor coestimulador CD28 necesario para completar la activación de las células T. En este estudio el riñón en isquemia fría fue transducido con un adenovirus que contenía las secuencias codificantes para CTLA4Ig, la expresión del

transgén prolongó la supervivencia de los animales sin necesidad de tratamiento inmunosupresor³⁴. El CMH también es un potencial candidato de terapia génica, la inyección en ratones receptores de fibroblastos transfectados con genes del CMH del donante produjo tolerancia en un modelo de trasplante cardíaco. El tercer punto de interés es la prevención del rechazo crónico del injerto en la modulación de genes implicados en fibrosis y aterosclerosis³³. Una de las posibles dianas son los fibroblastos, recientemente³⁵ se ha conseguido transfectar selectivamente *in vivo* fibroblastos sin afectar a las células tubulares epiteliales. Esto abre nuevas vías al tratamiento del rechazo crónico ya que potencialmente se puede inhibir la acción de TGF- β (reduciendo la fibrosis) o de PDGF (evitando proliferación). La terapia génica está todavía lejos de solucionar las complicaciones asociadas al trasplante renal. Entre los principales problemas a los que se enfrenta destacan^{30,31}: i) la transitoriedad y bajo nivel de expresión que se obtiene; ii) la respuesta inmune que generan los vectores que pueden promover procesos inflamatorios ocasionando la pérdida del órgano; iii) la redundancia de acciones de muchos genes diana; iv) la mayoría de genes diana tienen importantes funciones homeostáticas por lo que deberían ser estimuladas o inhibidas únicamente en el momento idóneo y en la línea celular adecuada²⁵ y v) la bioseguridad de los vectores, en este sentido preocupa la posible contaminación de los vectores con virus activos o la posible recombinación *in vivo* dando lugar a infección. El campo de la terapia génica está en continua expansión, el perfeccionamiento de los sistemas de liberación del transgén, acompañados de procedimientos que permitan un mayor seguridad, especificidad y estabilidad permitirán en un futuro la aplicación de estas metodologías a la clínica.

CONCLUSIONES

La aplicación de la biología molecular en el campo del trasplante renal, y del trasplante de órganos en general, abre importantes opciones con finalidades diagnóstica, pronóstica y terapéutica. En la actualidad la biología molecular nos permite un diagnóstico más precoz y preciso del rechazo agudo y crónico mediante la determinación de la expresión de una serie de genes en orina o en la biopsia renal. La utilización de los microarrays, con el análisis de miles de genes, permitirá un mejor conocimiento de los mecanismos de rechazo y tolerancia. La aplicación de la farmacogenética podría ser de gran utilidad en la individualización del tratamiento inmunosupresor, con la consiguiente mejora de los resultados del trasplante renal y de la tolerancia al tratamiento inmunosupresor. Y finalmente, la terapia génica esta demostrando su utilidad en diversos modelos experimentales, especialmente en la prevención del síndrome de isquemia-reperfusión. Es posible que en un futuro próximo la terapia génica nos permita individualizar al máximo el trasplante de órganos con la consiguiente optimización de los resultados a corto y largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC y cols.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001.
- Venter IC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RI y cols.: The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351, 2001.
- Subramanian G, Adams MD, Venter JC, Broder S: Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *JAMA* 286: 2296-2307, 2001.
- Raeymaekers L: General principles of quantitative PCR. In *Quantitative PCR Protocols* 1999: 31-41. Eds Kochanowski B & Reischl U. Totowa, NJ: Humana Press.
- Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193, 2000.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallone B, Bouillon R, Mathieu C: An overview of realtime quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25: 386-401, 2001.
- Syvänen AC: Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2: 930-941, 2001.
- Arcellana-Panlilio M, Robbins SM: Cutting-edge technology I. Global gene expression profiling using DNA microarrays. *Am J Physiol* 282 [Gastrointest Liver Physiol]: G397-402, 2002.
- Snidjers AM, Meijer GA, Brakenhoff RH, Van den Brule AIC, Van Diest PJ. Microarray techniques in pathology: tool or toy? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53: 289-294, 2000.
- Akalin E, Hendrix RC, Polavarapu RC, Pearson TC, Neylan IF, Larsen CP, Lakkis FG: Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology. *Transplantation* 72: 948-953, 2001.
- King HC, Sinha AA. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls. *JAMA* 286: 2280-2288, 2001.
- Van Gelder RN, Von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barches ID, Eberwine IH: Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci* 87: 1663-1667, 1990.
- Taniguchi M, Miura K, Iwao H, Yamanaka S: Quantitative assessment of DNA microarrays —comparison with Northern blot analyses. *Genomics* 71: 34-39, 2001.
- Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler I, Eng JK, Bumgarner R, Goodlett DR, Aebersold R, Hood L: Integrated genomic and proteomic analyses of a systemically perturbed metabolic network. *Science* 292: 929-934, 2001.
- Knepper MA: Proteomics and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 13: 1398-1408, 2002.
- Guo Z, Gatterman MS, Hood L, Hansen JA, Petersdorff. Oligonucleotide arrays for highthroughput SNPs detection in the class I genes: HLA-B as a model system. *Genome Res* 12: 447-457, 2001.
- Kamoun M: Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clin Biochem* 34: 29-34, 2001.
- Baan CC, Weimar W: Intergraft cytokine gene expression: implications for clinical transplantation. *Transplant Int* 1998; 11: 169-180.
- Baogui L, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Moudarian J, Schwartz JE, Suthanthiran M: Noninvasive diagnosis of renal allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *New Engl J Med* 344: 947-54, 2001.
- Zhang J, Tong KL, Li P, Chan A, Yeung CK, Pang C, Wong T, Lee KC, Lo D: Presence of donor- and recipient-derived DNA in cell-free urine samples of renal transplantation recipients: urinary DNA chimerism. *Clin Chem* 45: 1741-1746, 1999.
- Waaga AM, Gasser M, Laskowski I, Tilney NL: Mechanisms of chronic rejection. *Curr Op Immunol* 12: 517-521, 2000.
- Border WA, Noble NA: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New Engl J Med* 331: 1286-1292, 1994.
- Branton MH, Kopp 3B. TGF- β and fibrosis. *Microbes Infect* 1: 1349-1365, 1999.
- Campistol IM, Íñigo P, Lario S, Bescós M, Oppenheimer F. Role of transforming growth factor- β 1 in the progression of chronic allograft nephropaty. *Nephrol Dial Transplant* 16 (Supl. 1): 114-116, 2001.
- Johnson DW: Growth factors and progressive renal disease. *Nephrology* 5: 251261, 2000.
- Suthantiran M: The importance of genetic polymorphisms in renal transplantation. *Curr Op Urol* 10:71-75, 2000.
- Akalin E, Murphy B: Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Op Immunol* 13: 572-576, 2001.
- Danesi R, Mosca M, Boggi U, Mosca F, Del Tacca M: Genetics of drug response to immunosuppressive treatment and prospects for personalized therapy. *Mol Med Today* 6: 475-482, 2000.
- Imai E, Isaka Y: Strategies of gene transfer to the kidney. *Kidney Int* 1998; 53: 264-272.
- Zamir G, Olthoff KM, Shaked A: Gene therapy and graft modification. *Curr Op Organ Transplant* 6: 343-347, 2001.
- Kelley VR, Sukhatme VP. Gene transfer in the kidney. *Am J Physiol* 276 [Renal Physiol]: F1-F9, 1999.
- Imai E: Gene therapy approach in renal disease in the 21st century. *Nephrol Dial Transplant* 16: (Supl. 5): 26-34, 2001.

S. LARIO y cols.

33. Deng S, Brayman KL. Gene therapy strategies to facilitate organ transplantation. *Mol Med Today* 5: 400-405, 1999.
34. Tomasoni S, Azzollini N, Casiraghi F, Capogrossi MC, Remuzzi G, Benigni: CTLA4lg gene transfer prolongs survival and induces donor-specific tolerance in a rat renal allograft. *J Am Soc Nephrol* 11: 747-752, 2000.
35. Clarke HC, Cook HT, Hendry BM. Gene therapy for renal fibroblasts. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1615-1617, 1999.